

corresponding to (2)

## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

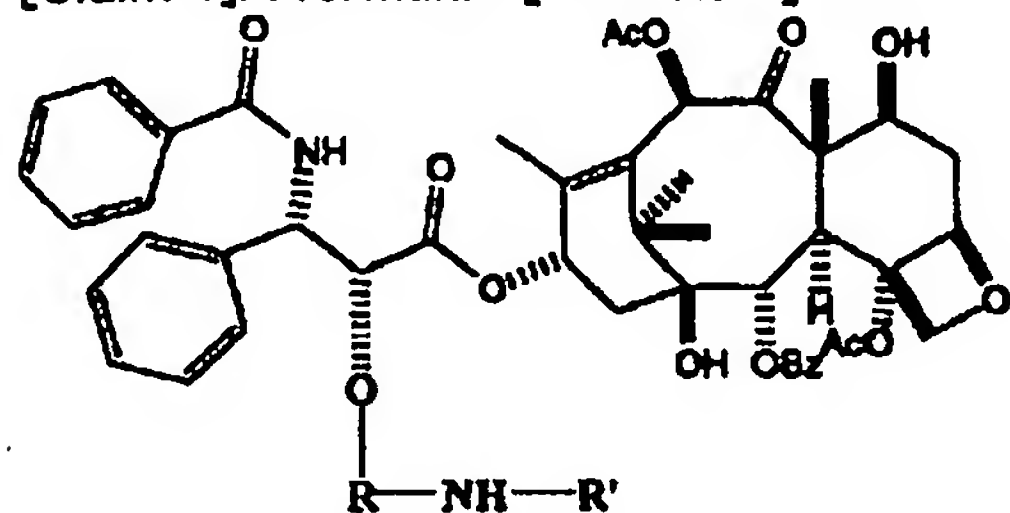
2.\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

## CLAIMS

[Claim(s)]

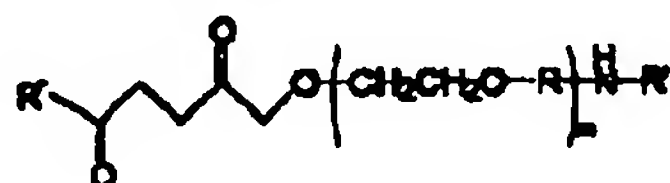
[Claim 1]A formula : [Formula 1]



$-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})-$  (however,  $n$  0-7) and  $\text{R}'$  are among [type, and  $\text{R}$  is the residue of somatostatin analog peptide. The compound shown by].

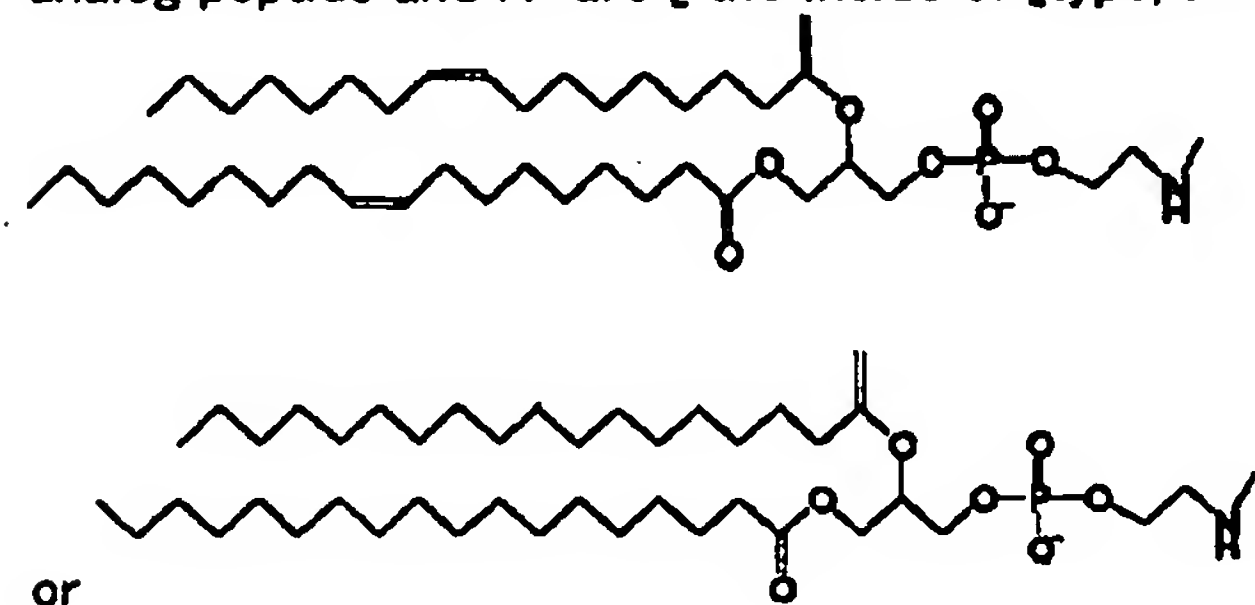
[Claim 2]The compound according to claim 1 in which somatostatin analog peptide is chosen from octreotide (SEQ ID NO:1), run REOCHIDO (SEQ ID NO:2), and BAPUREOCHIDO (SEQ ID NO:3).

[Claim 3]The compound according to claim 1 or 2 whose  $\text{R}$  is  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-$ .



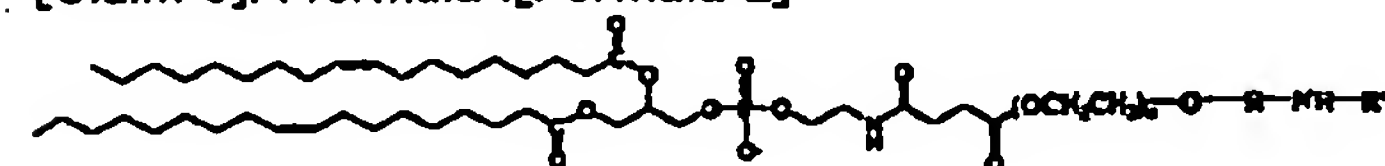
[Claim 4]A formula :

As for 22-220 and  $\text{R}'$ , in  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})-$  (however,  $n$  0-7) and  $m$ , residue of somatostatin analog peptide and  $\text{R}''$  are [ the inside of [type, and  $\text{R}$  ].



It comes out. A compound shown by].

[Claim 5]A formula :[Formula 2]



$-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{C}(\text{O})-$  (however,  $n$  0-7) and  $\text{R}'$  are among [type, and  $\text{R}$  is the residue of somatostatin analog peptide. The compound shown by].

[Claim 6]The compound according to claim 5 in which somatostatin analog peptide is chosen from octreotide (SEQ ID NO:1), run REOCHIDO (SEQ ID NO:2), and BAPUREOCHIDO (SEQ ID NO:3).

[Claim 7]The compound according to claim 5 or 6 whose R is  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{C}(\text{O})-$ .

[Claim 8]Liposome containing the compound according to any one of claims 5 to 7.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

**[Detailed Description of the Invention]**

[0001]Field this invention of an invention combines a new carcinostatic substance transmission system, especially a somatostatin analog with carcinostatic substances (for example, taxol (paclitaxel (paclitaxel)) etc.), and relates to the system the carcinostatic substance concerned was made to be delivered to a target cancer cell by it specifically.

[0002]Since the cytotoxic carcinostatic substance of many statement of a pertinent art lacks the common problem, i.e., an alternative drugs transmission system, it has the problem of demonstrating the toxic-like side effects. By using endocytosis ligand (endocytotic) as a carrier for making the cancer cell which is a target point to a carcinostatic substance, the toxic-like side effects can be avoided and the transmission efficiency of the drugs concerned can be improved notably.

[0003]Somatostatin functions via the cell membrane receptor known as a somatostatin receptor (SSTR). Excessive manifestation of these receptors is carried out on the surface of a certain kind of cancer cells (for example, carcinoid, islet cell adenoma, paraganglioma, a pulmonary small cell carcinoma, etc.). Since it has interest owner \*\*\*\*\* in this way, a somatostatin analog can be used as a carrier system to which a malignant tumor cell to which drugs act on those cells specifically pointed. X-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys]-X, The sign of the somatostatin analog containing X-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-X or X-c[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-X is carried out by coloring matter or radionuclide, Visualizing and monitoring the tumor which reveals SSTR is reported. A somatostatin analog has a size smaller than the original somatostatin, and its compatibility over a somatostatin receptor is high, and it is more preferred than the original somatostatins about the above-mentioned application from the place whose stability is size.

[0004]A somatostatin analog [ like octreotide (octreotide), run REOCHIDO (lanreotide), and BAPUREOCHIDO (vapretotide) ] whose abstract this invention of an invention is, It is related with the combination through a covalent bond or physical prehension with a carcinostatic substance like paclitaxel. Namely, :X-O-spacer NH-peptide whose this invention compound is what has the following general structure (the inside of a formula and X are the monomers for making the lipid or the polymer matrix for making a carcinostatic substance and liposome form).

[0005]Generally this invention X-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys]-X, X-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-X-c [ X or ] [Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-X Use the somatostatin analog which has the becoming arrangement and provide the new system for transmitting a carcinostatic substance to a cancer cell. composition of a somatostatin analog — Fmoc (9-fluorenyl carbomethoxy) — it can carry out by a solid-phase-peptide-synthesis on a plane by law. For example, like carcinostatic substances (for example, paclitaxel, doxorubicin, camptothecin, etc.), Transmitting to a target cell makes the compound of the request whose intention it has react to the spacer which has a carboxyl end group, it makes the complex of drugs and a spacer form, and ranks second, Coupling of the complex concerned is carried out to the amino terminal of somatostatin analog peptide on resin, and the last results object, i.e., a drugs-spacer peptide as shown in Drawing 1, is made to form.

[0006]This invention provides the method of compounding further the combination shown by a DOPE-PEG-spacer somatostatin analog.

The combination concerned is useful to preparation of a liposome drug agent transmission system, as shown in Drawing 1.

[0007]The various new features about this invention are pointed out to the claim which is making a part of indication of this application specification. The detailed statement including the drawing which the concrete purpose etc. which are attained by this invention, its operational advantage, and its use twist, and is shown below for a good understanding, and the concrete embodiment of this invention should be taken into consideration.

[0008]:Fmoc whose meaning of the detailed explanation cable address of a desirable mode is as follows: 9-fluorenyl carbomethoxy;

Trt: Triphenylmethyl;

Thr-ol: All [ SUREONINA ];

Phe: Phenylalanine;

Cys: Cystein;

Thr: Threonine;

Lys: Lysine;

Trp: Tryptophan;

DbetaNal: D-beta-(2-naphthyl) alanine;

TFA: Trifluoroacetic acid;

DMF: N,N-dimethylformamide;

THF: Tetrahydrofuran;

HBTU: 2-(1H-benzotriazol 1-yl)-1, 1 and 3, 3-tetramethyl RONIUMU hexafluorophosphate;

DMAP: 4-dimethylaminopyridine;

ACN: Acetonitrile;

DCM: Dichloromethane;

TIS: Triisopropyl silane;

PEG: Polyethylene glycol;

DOPE: Dioleoyl phosphatidylethanolamine;

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazole 2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.

[0009]In order for the activity of a carcinostatic substance to form the fully held stable combination, it is attained by using a dicarboxylic acid spacer like glutaric acid. One carboxyl group of a spacer forms the hydroxy group (for example, 2'-OH radical of paclitaxel) and ester bond of a carcinostatic substance, and the carboxyl group of another side forms the proper amino group and carvone amide group of a peptide carrier (for example, SOMASUTACHIN analog). May be used in order for all the somatostatin analogs which have N-terminal amino group of isolation to make it combine with a carcinostatic substance etc. via a spacer, but. Especially a desirable peptide carrier is the octreotide, run REOCHIDO, and BAPUREOCHIDO which are somatostatin analogs, and this is because they have high compatibility to the Homo sapiens somatostatin receptor subtypes 2, 5, and 4, respectively. The arrangement of these three desirable somatostatin analogs, : which is as follows -- octreotide: . D-Phe-c[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol) run REOCHIDO: DbetaNal-c [Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH<sub>2</sub> BAPUREOCHIDO: . D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Trp-NH<sub>2</sub>[0010]The

somatostatin analog used for the purpose of this invention may be obtained from what [ was compounded using publicly known art by the technical field concerned ], thing [ which was extracted from the natural community ], or commercial supply origin (Peninsula, neo cis-TEMUSU, a sigma, and BASF). The list of usable somatostatin analogs is indicated, for example to the volume Weil and on Muller and Thorner "Somatostatin" (1992).

Let the contents be a part of a statement of this specification.

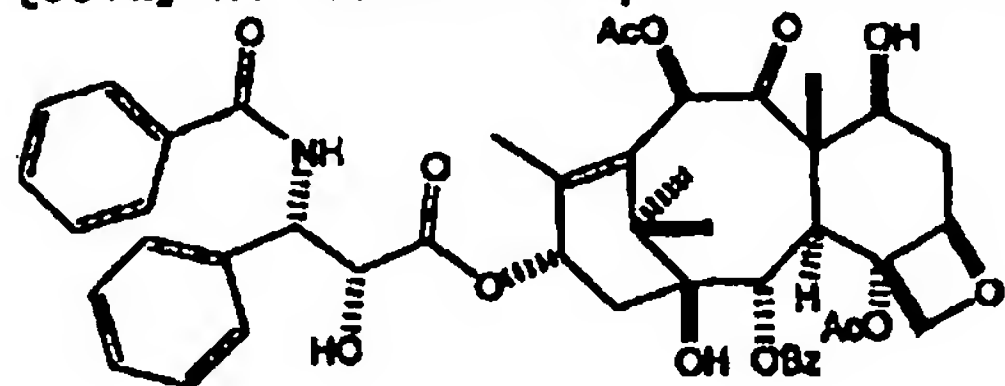
Preferably, somatostatin peptide is compounded using a conventional solid-phase-synthesis method.

[0011]By combining the desired compound X with one side of two carboxyl groups of the dicarboxylic acid spacer R, and combining a somatostatin analog with another side according to this invention, General formula :X-O-R-NH-R'[R is -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(O)- (n is 0-7) among a

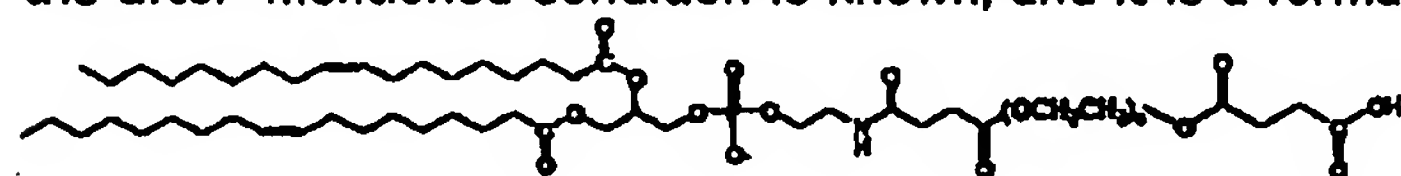


formula, and R' is the residue of somatostatin peptide. The results object expressed with] is acquired. As long as a somatostatin analog is elongated with the amino acid derivative which has a basis like the thio group of isolation, or a carboxyl group in N-end, Formula: The compound shown by  $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ ,  $\text{NH}_2-(\text{PEG})-\text{COOH}$ ,  $\text{HOOC}-(\text{PEG})-\text{COOH}$ , or  $\text{HOOC}-\text{X}$ -maleimide can also be used as a spacer.

[0012]The desirable compound X is a formula. : [Formula 3]



It comes out, and it is carcinostatic substance paclitaxel expressed, or forming liposome under the after-mentioned condition is known, and it is a formula. : [Formula 4]



It is PEG-DOPE come out of and expressed.

[0013]In addition to the above-mentioned compound, other compounds which can form the carboxyl group and ester bond of a spacer can be used for the purpose of this invention.

[0014]paclitaxel — refining of commercial supply origin (for example, \*\*\*\*\*-\*\* years Squibb) to natural resources — or it can compound and obtain with publicly known art by the technical field concerned. Generally it is available also in PEG or DOPE.

[0015]After making drugs and the combination of somatostatin form via a spacer, the biological activity is examined by cell cultivation.

[0016]Drawing 2 is a fluorescence microscope photograph figure for which the thing to which octreotide receives MCF-7 cell, and which is not combined to a CHO cell although it carries out and joins together specifically is shown. The panels A and C and the panels E and G show the gestalt of MCF-7 cell and a CHO cell, respectively. The panel B, D, and F respectively corresponding to the panels A, C, and E [ G and ] and H show the fluorescein labeling octreotide combined with MCF-7 cell and a CHO cell. With fluorescein labeling octreotide 100microg, after incubating MCF-7 cell and a CHO cell for 30 minutes at 4 \*\* among 1 ml of buffer solution, a cell is washed by PBS, and it fixes with paraformaldehyde 4%, and observes with a fluorescence microscope. As shown in the panels B and F, octreotide is not combined with a CHO cell although it combines with MCF-7 cell (panel B) (panel F). The octreotide combined with MCF-7 cell disappears under existence of superfluous non-labeling octreotide, and competes with labeling octreotide (panel D). Octreotide is not combined with a CHO cell even when a CHO cell is able to give high-concentration labeling octreotide.

[0017]It is shown that the labeling octreotide combined with MCF-7 cell internalized Drawing 3 in MCF-7 cytosol through somatostatin receptor-intervention endocytosis after incubating at labeling octreotide 100microg/ml and 37 \*\* for 1 hour.

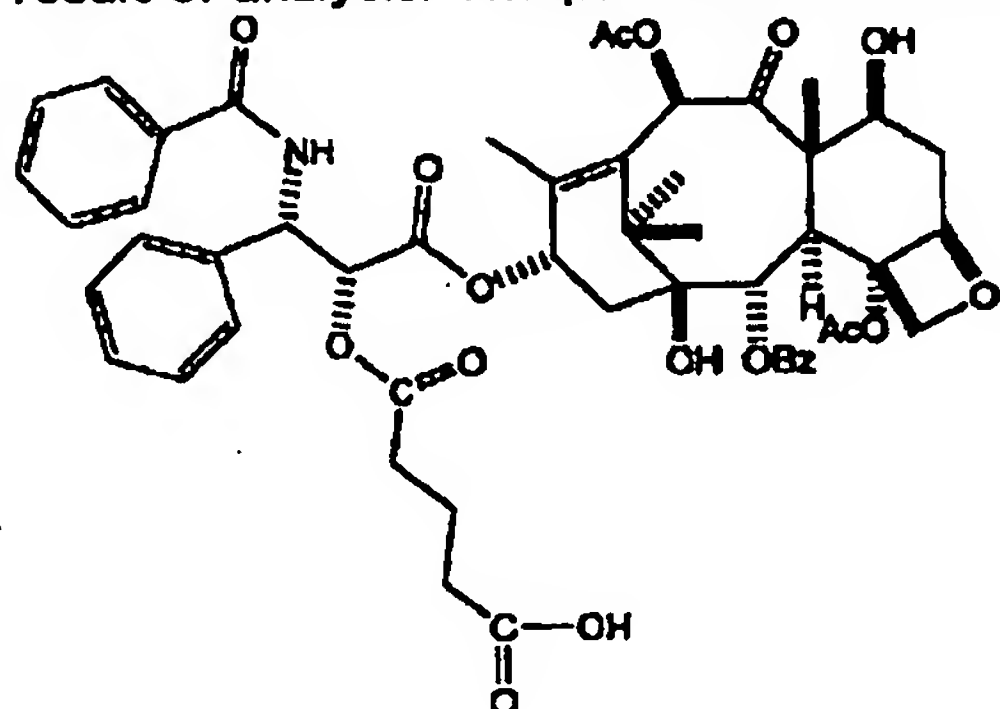
[0018]In Drawing 4, octreotide joint paclitaxel shows anti-cancer activity equivalent to uncombined paclitaxel through destruction of the microtubule formation of a cell. The panel A shows [ in / the bottom of existence of octreotide joint paclitaxel / in / the bottom of the absence of ten to 6 paclitaxel, or existence (A1) (A2) / in MCF-7 cell / (A3) ] destruction of the tubulin in intracellular [ concerned ]. Bar = 20 micrometers. B and C are what shows the chromatin condensation in a self-destructive (apoptotic) cell, . Dyed the transmission electron microscope photograph figure (B;X7,500;bar = 500 nm) or core of the hyperfine structure of self-destructive MCF-7 cell by the HOECHST 33258. ; which is a fluorescence microscope photograph figure (C;bar=10micrometer) — in addition, MCF-7 cell is a case where it processes for one day by octreotide joint paclitaxel (B3 and C3), when [ which was not processed by ten to 6 paclitaxel ] it case (B1 and C1) or processes (B-2 and C2).

[0019] Drawing 5 is what shows the cell singularity of octreotide joint paclitaxel. The panels A1 and B1 are the cases of unsettled MCF-7 cell and a CHO cell, respectively. The panel A2 and B-2 are the cases of MCF-7 cell processed for one day by paclitaxel (10<sup>-5</sup>M), and a CHO cell, respectively, and panel A3 and B3 are the cases of MCF-7 cell processed for one day by octreotide joint paclitaxel (10<sup>-5</sup>M), and a CHO cell, respectively. Unlike paclitaxel of the isolation which brings about the death of MCF-7 cell or a CHO cell, octreotide joint paclitaxel brings about only the death of MCF-7 cell, and as shown in panel A3 and B3, it does not bring about the death of a CHO cell. ;bar cell death is indicated to be by an arrow = 20 micrometers.

[0020] The new somatostatin binding compound of this invention may be used in the state of the constituent containing the carrier permitted in [ as the compound concerned ] medicine as a cancer disease treatment agent by prescribing a medicine for the patient to a cancer patient.

[0021] Although the following examples explain the embodiment of this invention further, the range of this invention does not receive restriction according to this example.

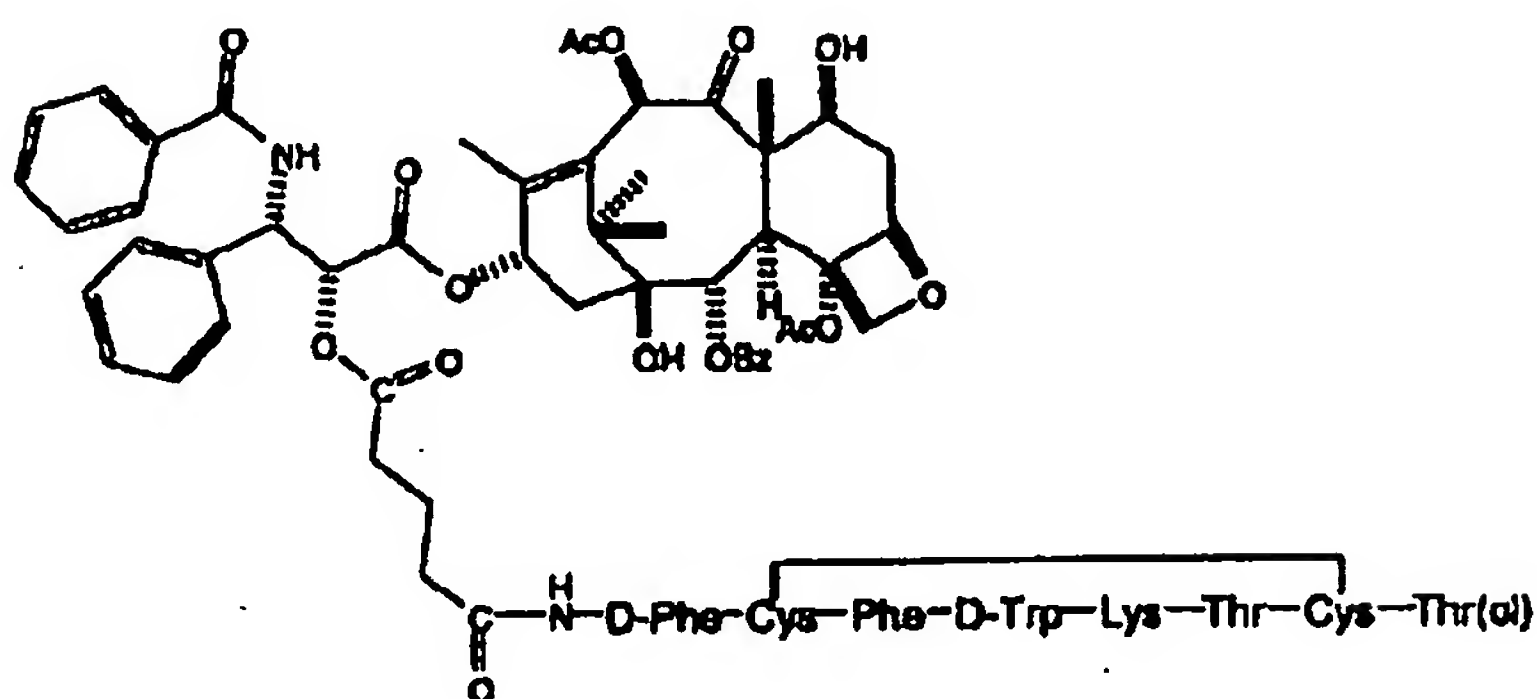
[0022] Synthetic paclitaxel (0.43g;0.5mmol) and the glutaric acid anhydride (0.86g;6mmol) of example 1 paclitaxel glutaryl octreotide were melted in 5 ml of pyridine, and it stirred at the room temperature for 3 hours. It was made to evaporate to dryness under reduced pressure at the time of ending reaction. Residue was processed and filtered under stirring for 20 minutes with 20 ml of water. Settlings were remelted to acetone and the micro crystallite (0.42g; 86% yield) of the paclitaxel GURUTA rate was obtained for water.  $[M+H]^+ m/z=968Da$  was given by ESM as a result of analysis. The paclitaxel GURUTA rate complex has the following structure. :[Formula 5]



[0023] The arrangement of octreotide is compounded by the solid phase technique which uses Fmoc. It is what has the following aggregate chain. a certain :NH<sub>2</sub> — by —D-Phe-Cys(Trt)-Phe-D-Trp-Lys(Mtt)-Thr-Cys(Trt)-Thr-ol-acetal cyber-amide resin (0.1mmol) .HBTU. The 4-mol equivalent weight of the activated paclitaxel GURUTA rate was applied as the 9th amino acid derivative, and coupling was carried out to octreotide. The terminal point of the reaction was monitored using the ninhydrin reaction which measures the isolation amino group which decreased in N-end.

[0024] Cleavage of the peptide bond object from amide resin was performed 1% TFA/5% using TIS/DCM. 15% pyridine / methanol neutralized, diluted with pH 7.5 buffer solution, disulfide formation was made to complete, it freeze-dried, and the compound which cleft obtained 135 mg of crude things. HPLC which uses a preparative column and an ACN/H<sub>2</sub>O elution system can

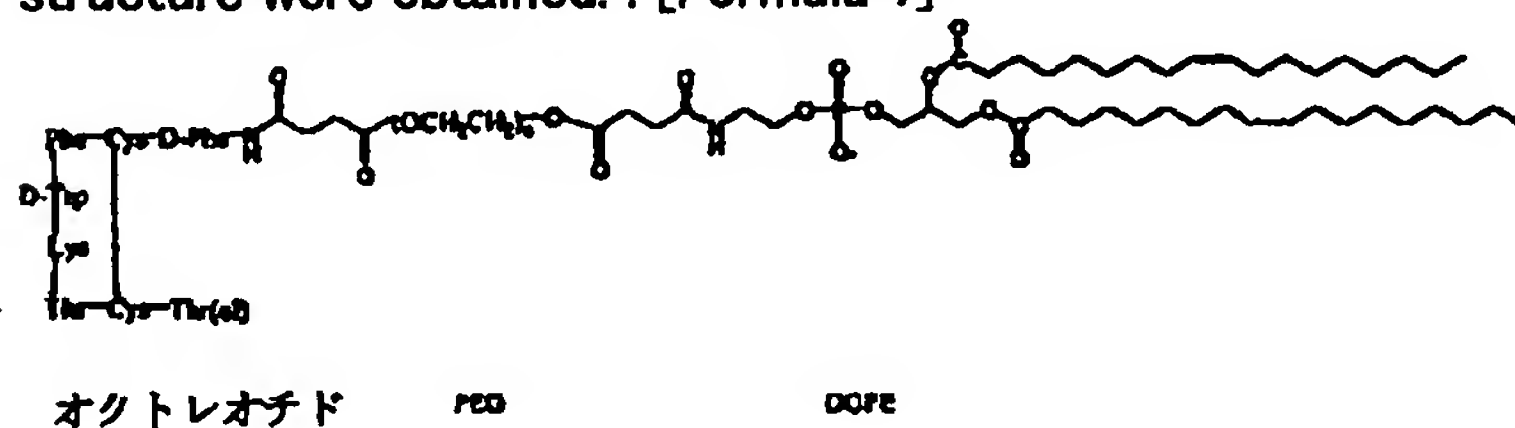
refine this further.  $[M+H]^+ m/z=1969Da$  was given by ESM as a result of analysis. The results object concerned has the following structure. : [Formula 6]



[0025] The 4-mol equivalent weight of synthetic 5-carboxy-fluorescein (0.4mmol) of example 2 fluorescein octreotide as an amino acid derivative, Fmoc Chemistry. Coupling is carried out to the aggregate chain of the  $\text{NH}_2$ -beta-Ala-D-Phe-Cys (Trt)-Phe-D-Trp-Lys(Mtt)-Thr-Cys(Trt)-Thr-ol-acetal cyber-amide resin (0.1mmol) compounded with the peptide synthesis machine to be used. Cleavage of the peptide bond object from amide resin was performed 95% TFA/5% using TIS. After evaporating the bottom TFA of decompression, ice-cooling dry ether was added and peptide was settled. \*\*\*\*(ing) settlings -- sintering glass -- a funnel -- cold ether washed in the top and the acetic acid solution extracted 20%. The peptide results object was diluted with the ammonium acetate solution to about 1 mM 5%, pH was adjusted to 7.5 with ammonium hydroxide (25%), and disulfide formation was performed. The sample was freeze-dried and it powdered.

$[M+H]^+ m/z=1448\text{Da}$  was given by ESM as a result of analysis.

[0026] The composition PEG (g [ 1 ], 0.5mmol) and the succinic acid anhydride (0.1 g, 1mmol) of example 3DOPE-PEG-octreotide were dissolved in THF by addition of DMAP. This solution was stirred at 50 \*\* under flowing back for 6 hours. It was made to evaporate under decompression of a solution after ending reaction, \*\*\*\*- PEG was obtained, and the flash chromatography of the residue on silica gel refined this. \*\*\*\*- PEG (0.4mmol) of four mol equivalents, and DOPE (0.4mmol) of four mol equivalents, NH -- as the 9th and 10th amino acid derivatives to a  $\text{D}_2$ -D-Phe-Cys(Trt)-Phe-D-Trp-Lys(Mtt)-Thr-Cys(Trt)-Thr-ol-acetal cyber-amide resin aggregate (0.1mmol), Coupling was carried out one by one. Cleavage of the peptide bond object from amide resin was performed 1% TFA/5% using TIS/DSM. 15% pyridine / methanol neutralized, and diluted the compound which cleft with pH 7.5 buffer solution, it made disulfide formation complete, was freeze-dried, and the crude things which have the following structure were obtained. : [Formula 7]



This thing was used for preparation of liposome.

[0027] Example 4 liposome-preparation liposome was prepared by lipid / surface-active agent mixed micelle, and was given to the adjusted dialysis. The 10-ml chloroform / ethanol (capacity factor 2:1) solution of JISUTE aroyl phosphatidylcholine (DSPC) / cholesterol / DOPE-PEG-octreotide (mole ratio 10:1:1), It mixed with sodium cholate (lipid / cholate mole ratio 0.6), and was made to evaporate to dryness at 55 \*\* among a round bottom flask and under decompression. 10mM phosphate buffer pH7.4 (5 ml) was distributed, and the remaining thin film was adjusted to ionic strength 0.16. The mixed micelle was formed automatically. After carrying out short-time equilibration, the mixed micelle solution was dialyzed at 60 \*\* for 24 hours by the mini -\*\*\*\* prep (MINI-LIPOPREP) (Sialomed, Inc., USA) which uses the cellulose disk film of 10,000 molecular-weight cutoff. Thus, the prepared liposome was directly used for assay.



[0028]In the case of the carcinostatic substance encapsulated to liposome, the doxorubicin in the case of hydration at a rate of PL in 1.55mM ammonium sulfate solution / doxorubicin =10 / 1 (w/w). In addition to the dry thin lipid membrane (thin lipid film) in a round bottom flask, the incubation was carried out at 60 °C for 24 hours. The TSKHW40 gel column equilibrated with 123mM sodium acid citrate (pH=5.5) separated encapsulation liposome and the isolation doxorubicin. The concentration of the encapsulation doxorubicin was measured by spectrophotometry (wavelength = 490 nm).

[0029]This invention is not limited by the mode of the above-mentioned implementation mentioned as an example, is in the scope of protection defined by the claim, and can be changed variously.

[0030]

[Layout Table]

SEQUENCE LISTING <110> ACADEMIA SINICA<120> A Novel Anti-cancer Drug Delivery System< 130> 172394<140><141><160> 3 <170> PatentIn Ver. 2.1<210> 1<211> 8< PRT[ 212> ]<220> <223> Xaa=Thr(ol) <400> 1Phe Cys Phe Trp. Lys Thr Cys Xaa1 5 <210> 2<211> 8<212> PRT<220> <223> Xaa=beta-(2-naphthyl)alanine< 400> 2Xaa Cys Tyr Trp Lys Val Cys Thr 1 5 <210> 3<211> 8<212> PRT<400> 3Phe Cys Tyr Trp Lys Val Cys Trp 1 5

---

[Translation done.]

BA

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2002-47298  
(P2002-47298A)

(43)公開日 平成14年 2 月12日 (2002. 2. 12)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト <sup>8</sup> (参考)
C 0 7 K 7/06	Z N A	C 0 7 K 7/06	4 C 0 7 6
// A 6 1 K 9/127		A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 4
38/22		47/48	4 G 0 0 5
47/48		A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00		A 6 1 K 37/24	

審査請求 有 請求項の数 8 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-208258(P2000-208258)	(71)出願人	596118493 アカデミア・シニカ ACADEMIA SINICA 台湾タイペイ、ナンカン、イエン・チュ ー・ユアン・ロード、セクション2、128 番
(22)出願日	平成12年 7 月10日 (2000. 7. 10)	(72)発明者	シュイー・ティン・チェン 台湾105タイペイ、ウーロン・ストリート、 レイン188、27番
		(74)代理人	100062144 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規抗がん剤伝達系

(57)【要約】

【課題】 多くの細胞毒性抗がん剤が選択的薬剤伝達系を欠くことにより毒性的副作用を有するという問題の解決を図ると共に、薬剤の伝達効率を改善する。

【解決手段】 本発明は、一般式：パクリタキセル(またはPEG-DOPE)-O-R-NH-R' [式中、Rはジカルボン酸残基であり、R' はソマトスタチン類縁体である] で表される新規がん治療化合物を使用して、抗がん剤をがん細胞に伝達するための新しい系を提供する。当該化合物は固相法により合成される。

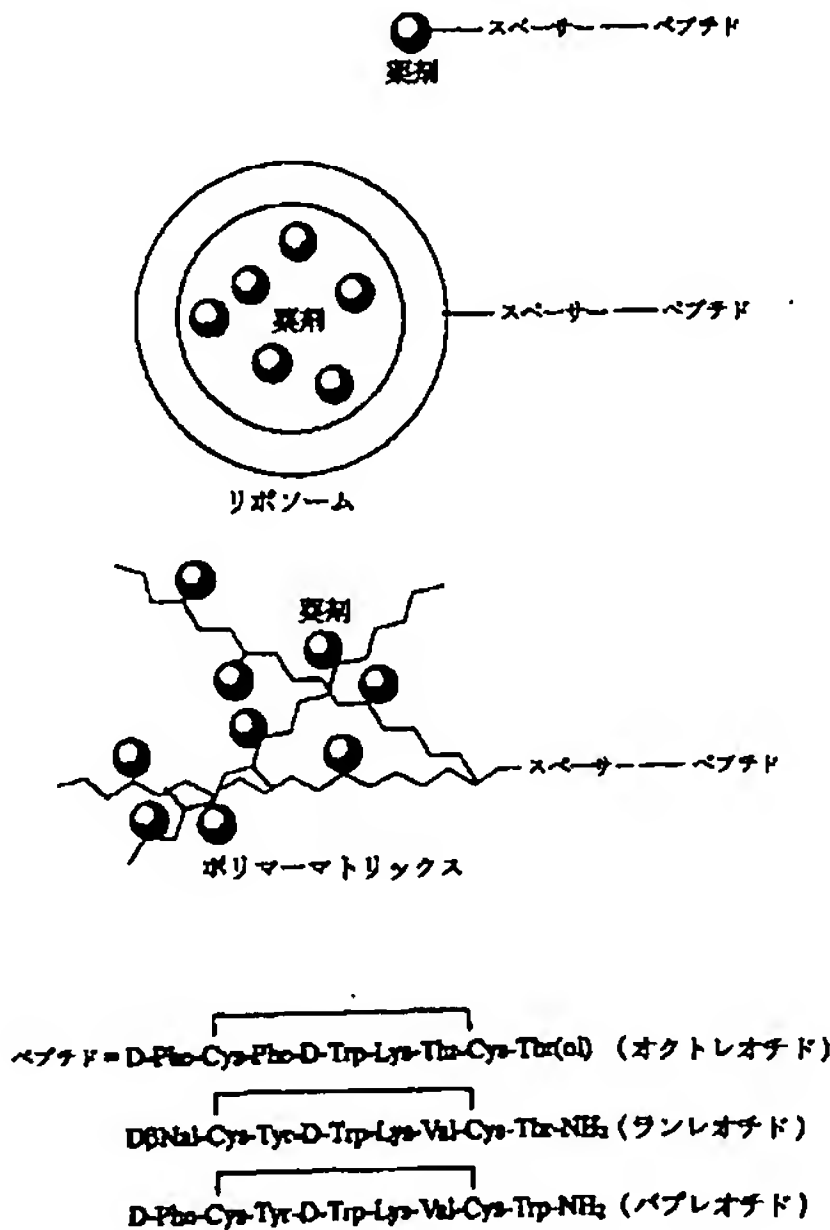
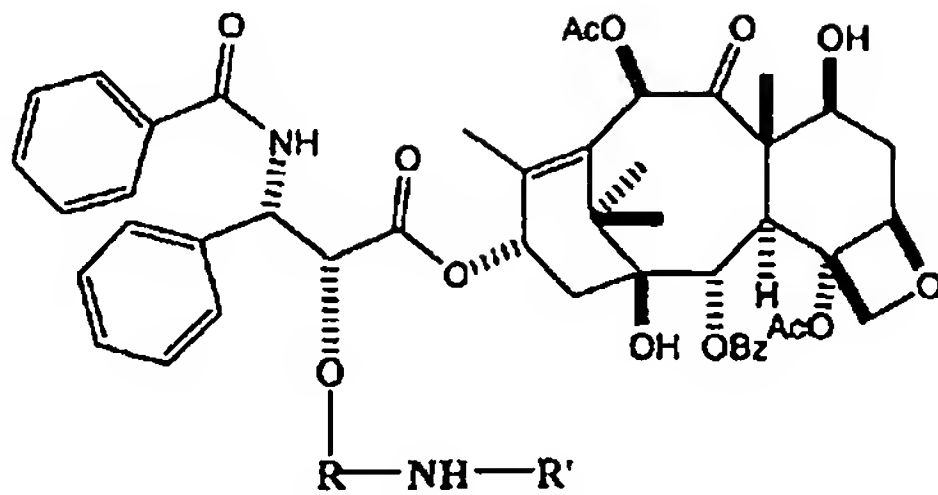


FIG.1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 式：

【化1】



[式中、Rは-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(O)- (ただし、nは0～7)、R'はソマトスタチン類縁体ペプチドの残基。]で示される化合物。

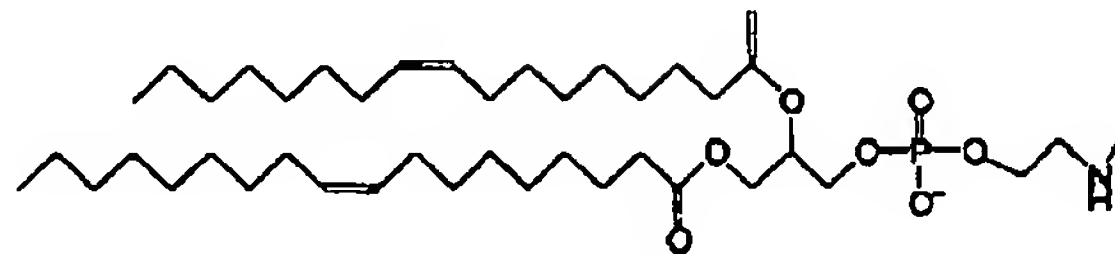
【請求項2】 ソマトスタチン類縁体ペプチドがオクトレオチド (SEQ ID NO:1)、ランレオチド (SEQ ID NO:2) およびバプレオチド (SEQ ID NO:3) から選択されたものである、請求項1記載の化合物。

【請求項3】 Rが-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-である、請求項1又は2記載の化合物。

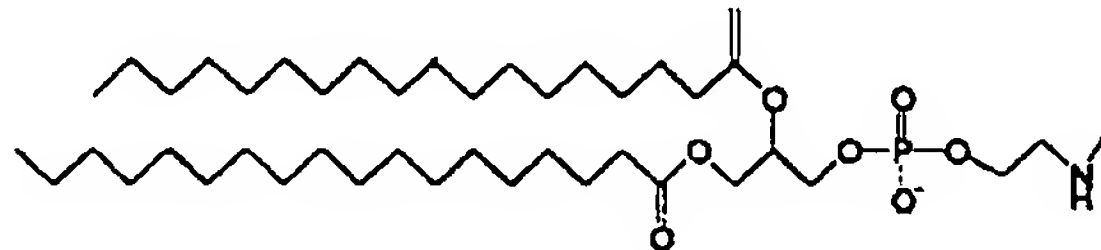
【請求項4】 式：



[式中、Rは-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(O)- (ただし、nは0～7)、mは22-220、R'はソマトスタチン類縁体ペプチドの残基、およびR''は

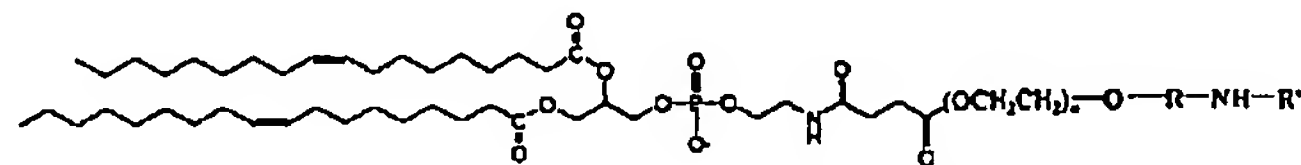


または



である。]で示される化合物。

【請求項5】 式：



[式中、Rは-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(O)- (ただし、nは0～7)、R'はソマトスタチン類縁体ペプチドの残基。]で示される化合物。

【請求項6】 ソマトスタチン類縁体ペプチドがオクトレオチド (SEQ ID NO:1)、ランレオチド (SEQ ID NO:2) およびバプレオチド (SEQ ID NO:3) から選択されたものである、請求項5記載の化合物。

【請求項7】 Rが-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)-である、請求項5又は6記載の化合物。

【請求項8】 請求項5～7のいずれかに記載の化合物を含有する、リポソーム。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】 発明の分野

本発明は、新規抗がん剤伝達系、特にソマトスタチン類縁体を抗がん剤 (例えばタキソール (パクリタキセル (paclitaxel)) など) と結合させ、それによって当該抗がん剤が標的がん細胞に特異的に伝達されるようにした系に関するものである。

## 【0002】 関連技術の記載

多くの細胞毒性抗がん剤は、共通の問題点、すなわち選

択的薬剤伝達系を欠いているため、毒性的副作用を発揮するという問題点を有している。抗がん剤を標的であるがん細胞に指向させるための担体としてエンドサイトシス (endocytotic) リガンドを使用することにより、毒性的副作用を回避し、当該薬剤の伝達効率を顕著に改善することが出来る。

【0003】 ソマトスタチンは、ソマトスタチン受容体 (SSTR) として知られる細胞膜受容体を介して機能する。これらの受容体は、ある種のがん細胞 (例えばカルチノイド、膵島細胞腫、傍神経節腫、肺小細胞癌など) の表面で過剰発現される。ソマトスタチン類縁体は、このように興味有る性質を有しているので、薬剤がそれらの細胞に特異的に作用するような悪性腫瘍細胞に指向された担体系として使用することが出来る。X-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys]-X、X-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-X または X-c[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-X を含むソマトスタチン類縁体を色素又は放射性核種で標識して、SSTRを発現する腫瘍を可視化し、モニターすることが報告されている。ソマトスタチン類縁体は、元のソマトスタチンよりも大きさが小さく、ソマトスタチン受容体に

【化2】

対する親和性が高く、安定性が大であるところから、上記した適用について、元のソマトスタチン類よりも好ましい。

#### 【0004】発明の要約

本発明は、オクトレオチド (octreotide)、ランレオチド (lanreotide) およびバプレオチド (vapretotide) のようなソマトスタチン類縁体と、パクリタキセルのような抗がん剤との、共有結合または物理的捕捉を介した結合体に関するものである。すなわち、本発明化合物は、次の一般的構造を有するものである：

X-O-スパーサー-NH-ペプチド

(式中、Xは抗がん剤、リボソームを作るための脂質又はポリマーマトリックスを形成させるためのモノマーである)。

【0005】一般に、本発明は、X-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Thr-Cys]-X、X-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-X またはX-c[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Xなる配列を有するソマトスタチン類縁体を使用して、抗がん剤をがん細胞に伝達するための新しい系を提供するものである。ソマトスタチン類縁体の合成は、Fmoc (9-フルオレニルメトキシカルボニル) 法により、固相ペプチド合成機上で行

Fmoc: 9-フルオレニルメトキシカルボニル；

Trt: トリフェニルメチル；

Thr-ol: スレオニナオール；

Phe: フェニルアラニン；

Cys: システイン；

Thr: スレオニン；

Lys: リジン；

Trp: トリプトファン；

DβNal: D-β-(2-ナフチル)アラニン；

TFA: トリフルオロ酢酸；

DMF: N, N-ジメチルホルムアミド；

THF: テトラヒドロフラン；

HBTU: 2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1, 1, 3, 3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート；

DMAP: 4-ジメチルアミノピリジン；

ACN: アセトニトリル；

DCM: ジクロロメタン；

TIS: トリイソプロピルシラン；

PEG: ポリエチレングリコール；

DOPE: ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン；

MTT: 3-[4, 5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2, 5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド。

【0009】抗がん剤の活性が十分に保持された、安定な結合体を形成するには、グルタル酸のようなジカルボン酸スパーサーを使用することによって達成される。スパーサーの一方のカルボキシル基は、抗がん剤のヒドロキシ基 (例えばパクリタキセルの2'-OH基) とエステル結合を形成し、他方のカルボキシル基は、ペプチド担体 (例えばソマトスタチン類縁体) の適宜のアミノ基と

うことが出来る。例えば、抗がん剤 (例えばパクリタキセル、ドキソルビシン、カンプトテシンなど) のような、標的細胞へ伝達することが意図されている所望の化合物を、カルボキシル末端基を有するスパーサーと反応させて薬剤とスパーサーの複合体を形成させ、次いで、当該複合体を樹脂上でソマトスタチン類縁体ペプチドのN末端にカップリングさせて、最終成績体、すなわち第1図に示すような薬剤-スパーサー-ペプチドを形成せしめる。

【0006】本発明は、更に、DOPE-PEG-スパーサー-ソマトスタチン類縁体で示される結合体を合成する方法を提供するものであり、当該結合体は第1図に示すようにリボソーム薬剤伝達系の調製に有用なものである。

【0007】本発明に関する種々の新規な特徴は、本願明細書の開示の一部をなしている特許請求の範囲に指摘されている。本発明、その実施上の利点、その使用により達成される具体的な目的などのより良い理解のために、以下に示す図面及び本発明の具体的な実施態様を含む詳細な記載が参酌されるべきである。

【0008】好ましい態様の詳細な説明

略号の意義は、次のとおりである：

カルボンアミド基を形成する。遊離のN-末端アミノ基を有するすべてのソマトスタチン類縁体がスパーサーを介して抗がん剤などと結合させるために使用されてよいが、特に好ましいペプチド担体はソマトスタチン類縁体であるオクトレオチド、ランレオチド及びバプレオチドであって、これはそれらがそれぞれヒトソマトスタチン受容体サブタイプ2、5及び4に対して高い親和性を有



するからである。これら3つの好ましいソマトスタチン類縁体の配列は、次のとおりである：

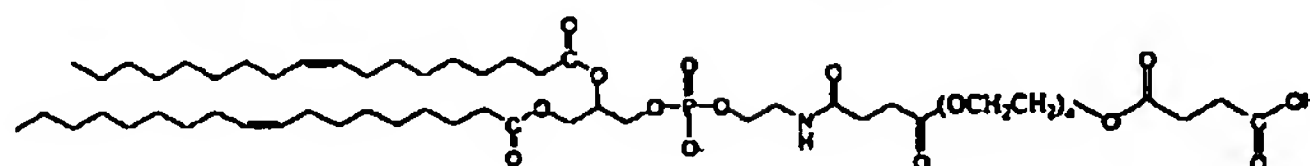
オクトレオチド： D-Phe-c[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr(ol)

ランレオチド： D $\beta$ Nal-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH<sub>2</sub>

バプレオチド： D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Trp-NH<sub>2</sub>

【0010】本発明の目的のために使用されるソマトスタチン類縁体は、当該技術分野で公知の技術を用いて合成されたもの、天然界から抽出されたもの又は商業的供給元（ペニンシュラ、ネオシステムス、シグマ及びBASF）から得られたものであってよい。使用可能なソマトスタチン類縁体のリストは、例えばWeil, Muller and Thorner編「Somatostatin」（1992）に記載されており、その内容を本明細書の記載の一部とする。好ましくは、ソマトスタチンペプチドは、常套の固相合成法を用いて合成されたものである。

【0011】本発明に従って、所望の化合物Xをジカルボン酸スペーサーRの2つのカルボキシル基の一方と結合させ、ソマトスタチン類縁体を他方と結合させること



で表されるPEG-DOPEである。

【0013】上記した化合物に加え、スペーサーのカルボキシル基とエステル結合を形成することが出来る他の化合物も、本発明の目的のために使用することが出来る。

【0014】パクリタキセルは、商業的供給元（例えばブリストル・マイヤーズ・スクイブ）から、天然資源の精製により或いは当該技術分野で公知の技術で合成して、得ることができる。PEGやDOPEも一般に入手可能である。

【0015】スペーサーを介して、薬剤とソマトスタチンの結合体を形成させてから、その生物学的活性を細胞培養法により試験する。

【0016】第2図は、オクトレオチドがMCF-7細胞に対すして特異的に結合するが、CHO細胞に対しては結合しないことを示す、蛍光顕微鏡写真図である。パネルAとC及びパネルEとGは、それぞれMCF-7細胞及びCHO細胞の形態を示す。パネルA、C、E及びGにそれぞれ対応するパネルB、D、F及びHは、MCF-7細胞及びCHO細胞に結合するフルオレセイン標識化オクトレオチドを示す。MCF-7細胞とCHO細胞を、フルオレセイン標識化オクトレオチド100 $\mu$ gと共に、緩衝液1ml中、4℃で30分間インキュベートした後、細胞をPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡で観察する。パネルBとFに示すように、オクトレオチドはMCF-7細胞には結合するが（パネルB）、CHO細胞には結

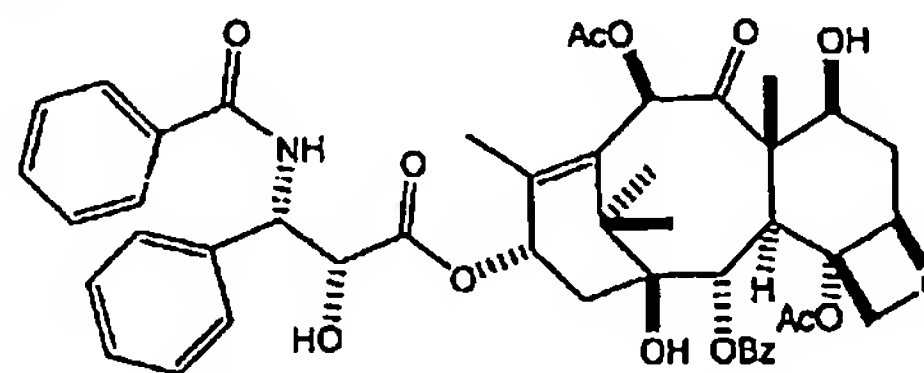
により、一般式：

X-O-R-NH-R'

〔式中、Rは-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C(=O)-（nは0～7）であり、R'はソマトスタチンペプチドの残基である。〕で表される成縁体を得る。ソマトスタチン類縁体がN-末端において遊離のチオ基やカルボキシル基のような基を有するアミノ酸誘導体で伸長される限り、式：NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH、NH<sub>2</sub>-(PEG)-COOH、HOOC-(PEG)-COOH又はHOOC-X-マレイミドで示される化合物もまた、スペーサーとして使用出来る。

【0012】好ましい化合物Xは、式：

【化3】



で表される抗がん剤パクリタキセルであるか、後記条件下にリボソームを形成することが知られており、式：

【化4】

合しない（パネルF）。MCF-7細胞に結合したオクトレオチドは、過剰の非標識化オクトレオチドの存在下に消失し、標識化オクトレオチドと競合する（パネルD）。オクトレオチドは、CHO細胞が高濃度の標識化オクトレオチドを与えられた場合でも、CHO細胞に結合しない。

【0017】第3図は、MCF-7細胞に結合した標識化オクトレオチドが、標識化オクトレオチド100 $\mu$ g/mlと37℃で1時間インキュベートした後において、ソマトスタチン受容体-介在エンドサイトーシスを経て、MCF-7サイトゾル中に内在化したことを示すものである。

【0018】第4図において、オクトレオチド結合パクリタキセルは、細胞の微小管形成の破壊を通して、非結合パクリタキセルと同等の抗がん活性を示している。パネルAは、MCF-7細胞が10-6パクリタキセルの不存在下（A1）又は存在下（A2）において若しくはオクトレオチド結合パクリタキセルの存在下（A3）において、当該細胞内におけるチューブリンの破壊を示している。Bar=20 $\mu$ m。BとCは、自滅的（apoptotic）細胞におけるクロマチン縮合を示すものであって、自滅的MCF-7細胞の超微細構造の透過型電子顕微鏡写真図（B；X7,500；bar=500nm）又は核をヘキスト33258で染色した、蛍光顕微鏡写真図（C；bar=10 $\mu$ m）である；なお、MCF-7細胞は、10-6パクリタキセルで処理しなかった場合（B1とC1）又は処理した場合（B2とC2）若しくはオクトレオチド結合パクリタキセル（B3と

C3) で1日間処理した場合である。

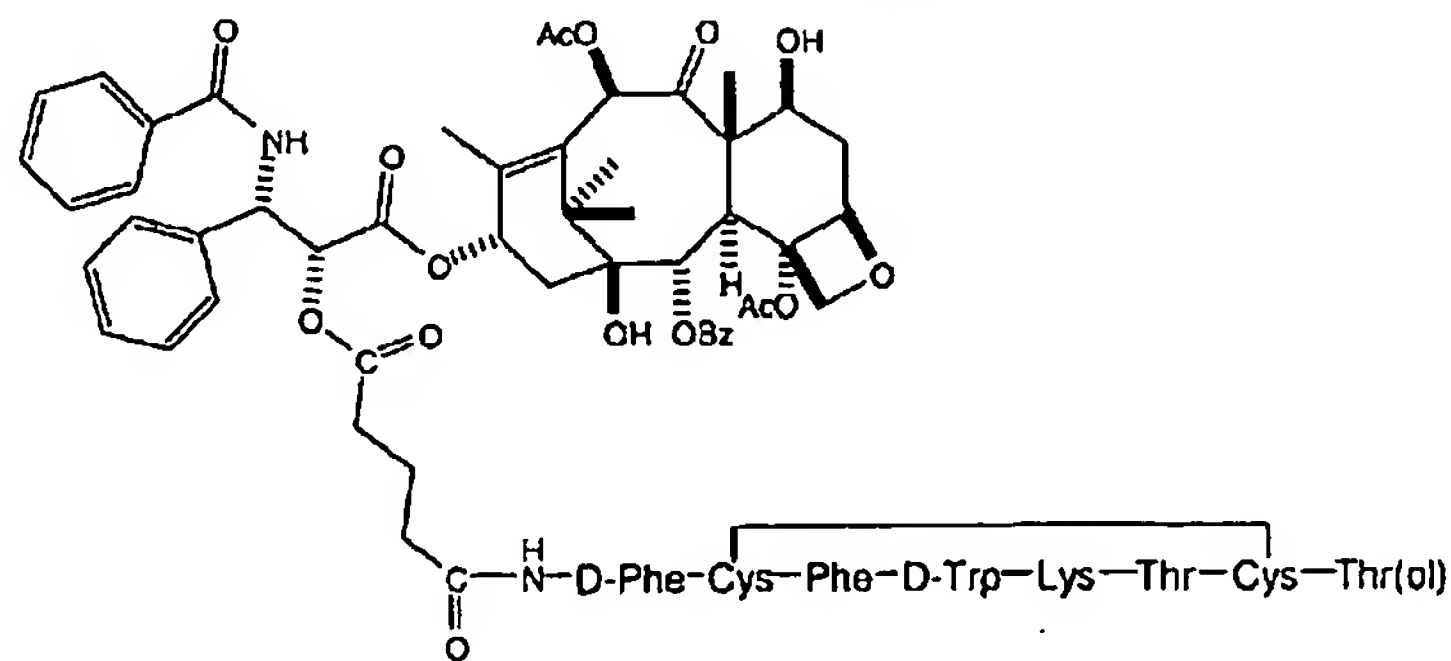
【0019】第5図は、オクトレオチド結合パクリタキセルの細胞特異性を示すものであって、パネルA1とB1はそれぞれ未処理MCF-7細胞とCHO細胞の場合であり、パネルA2とB2はそれぞれパクリタキセル(10-5M)で1日間処理したMCF-7細胞とCHO細胞の場合であり、パネルA3とB3はそれぞれオクトレオチド結合パクリタキセル(10-5M)で1日間処理したMCF-7細胞とCHO細胞の場合である。MCF-7細胞やCHO細胞の死をもたらす遊離のパクリタキセルとは異なり、オクトレオチド結合パクリタキセルは、MCF-7細胞の死のみをもたらし、パネルA3とB3に示されるように、CHO細胞の死をもたらさない。細胞死は、矢印によって示される；bar=20μm。

【0020】本発明の新規ソマトスタチン結合化合物は、当該化合物と医薬的に許容される担体を含む組成物の状態で、がん患者に対して投与することによる、がん疾患処置剤として使用されてよい。

【0021】本発明の実施態様を更に以下の実施例で説明するが、本発明の範囲はこの実施例によって制限を受けるものではない。

#### 【0022】実施例1

パクリタキセル-グルタリル-オクトレオチドの合成  
パクリタキセル(0.43g; 0.5mmol)とグルタール酸無水物(0.86g; 6mmol)をピリジン5mlに溶かし、室温で3時間攪拌した。反応終了時、減圧で蒸発乾固させた。残渣を水20mlで20分間攪拌下に処理し、ろ過した。沈澱物をアセトンに再溶解し、水をパクリタキセル-グルタレートの微結晶(0.42g; 86%収率)を得た。分析の結果、ESMにより、 $[M+H]^+ m/z = 968 Da$ を与えた。パクリタキセル-グルタレート複合体は、次の構造を有している：

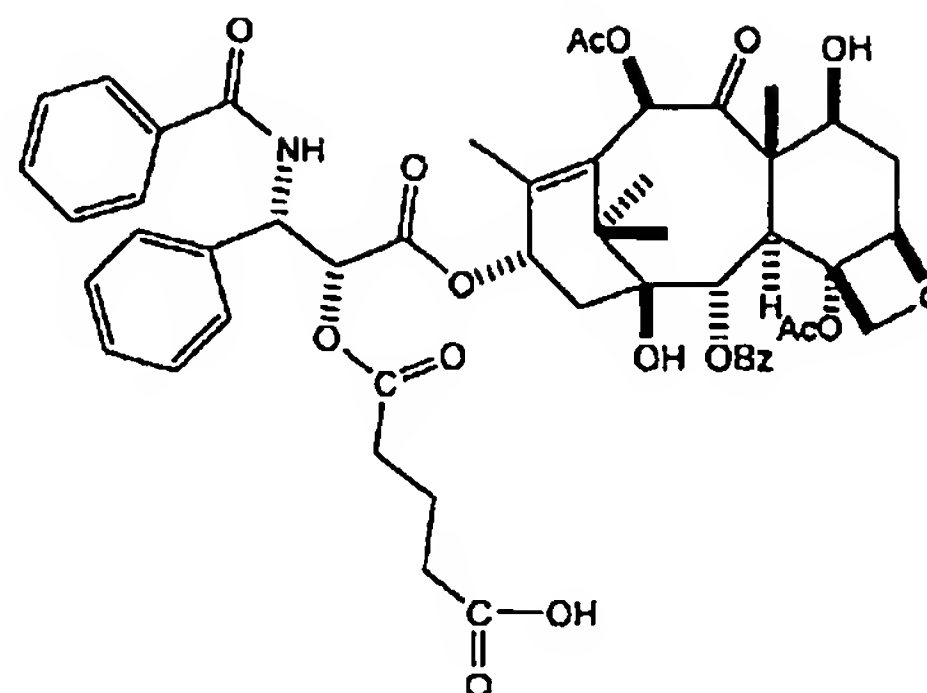


#### 【0025】実施例2

フルオレセイン-オクトレオチドの合成

5-カルボキシーフルオレセイン(0.4mmol)の4モル等量を、アミノ酸誘導体として、Fmoc Chemistryを用いるペプチド合成機で合成するNH<sub>2</sub>-β-Ala-D-Phe-Cys(Trt)-Phe-D-Trp-Lys(Mtt)-Thr-Cys(Trt)-Thr-ol-アセタール-サイバーアミドレジン(0.1

#### 【化5】



【0023】オクトレオチドの配列は、Fmocを使用する固相法により合成され、次ぎの集合体鎖を有するものである：NH<sub>2</sub>-D-Phe-Cys(Trt)-Phe-D-Trp-Lys(Mtt)-Thr-Cys(Trt)-Thr-ol-アセタール-サイバーアミドレジン

(0.1mmol)。HBTUによって活性化されたパクリタキセル-グルタレートの4モル等量を第9アミノ酸誘導体として加え、オクトレオチドとカップリングさせた。反応の終点は、N-末端において減少した遊離アミノ基を測定するニンヒドリン反応を用いてモニターした。

【0024】アミド樹脂からのペプチド結合体の開裂は、1%TFA/5%TIS/DCMを使用して行なわれた。開裂した化合物は、15%ピリジン/メタノールで中和し、pH7.5の緩衝液で希釈してジスルフィド形成を完了させ、凍結乾燥して粗製物135mgを得た。これを、更に、プレパラティブカラムとACN/H<sub>2</sub>O溶出系を使用するHPLCによって、精製することが出来る。分析の結果、ESMにより、 $[M+H]^+ m/z = 1969 Da$ を与えた。当該成績体は、次の構造を有している：

#### 【化6】

mmol)の集合体鎖にカップリングさせる。アミド樹脂からのペプチド結合体の開裂は、95%TFA/5%TISを使用して行なわれた。減圧下TFAを蒸発させた後、氷冷乾燥エーテルを加えて、ペプチドを沈澱させた。沈澱物をろ取し、焼結ガラスロート上で冷エーテルで洗浄し、20%酢酸溶液で抽出した。ペプチド成績体を5%酢酸アンモニウム溶液で約1mMに希釈し、pHを水酸化アンモ

ニウム(25%)で7.5に調節し、ジスルフィド形成を行った。試料を凍結乾燥して、粉末にした。分析の結果、ESMにより、 $[M+H]^+ m/z = 1448 Da$ を与えた。

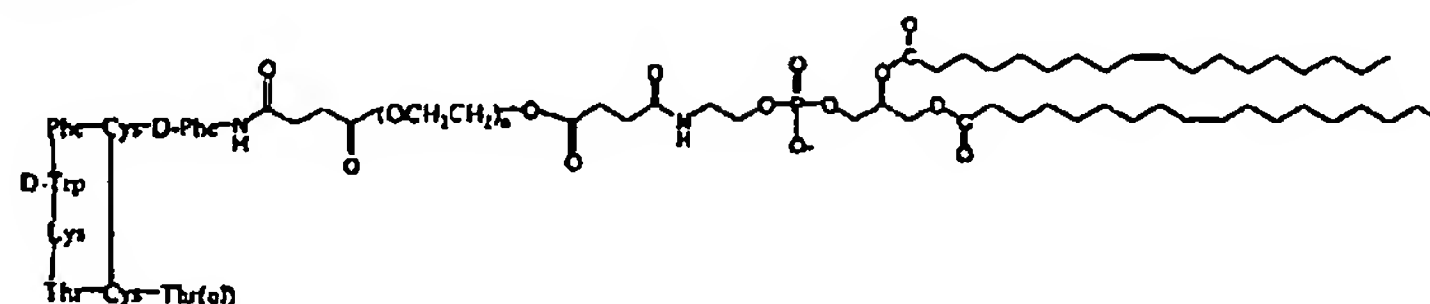
### 【0026】実施例3

#### DOPE-PEG-オクトレオチドの合成

PEG (1g, 0.5mmol) とコハク酸無水物 (0.1g, 1mmol) を、DMAPの添加により、THFに溶解させた。この溶液を還流下、50℃に6時間攪拌した。反応終了後、溶液を減圧下に蒸発させて、ジサクシニル-PEGを得、これをシリカゲル上の残渣のフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。4モル当量のジサクシニル-PEG (0.4m

mol) と4モル当量のDOPE (0.4mmol) を、 $NH_2$ -D-Phe-Cys(Trt)-Phe-D-Trp-Lys(Mtt)-Thr-Cys(Trt)-Thr-ol-アセタール-サイバーアミドレジン集合体 (0.1mmol) に対して第9及び第10のアミノ酸誘導体として、順次カップリングさせた。アミド樹脂からのペプチド結合体の開裂は、1%TFA/5%TIS/DSMを使用して行なわれた。開裂した化合物は、15%ピリジン/メタノールで中和し、pH7.5の緩衝液で希釈してジスルフィド形成を完了させ、凍結乾燥して、次ぎの構造を有する粗製物を得た：

### 【化7】



オクトレオチド PEG

DOPE

このものをリボソームの調製に使用した。

### 【0027】実施例4

#### リボソーム製剤

リボソームを、脂質/界面活性剤混合ミセルによって調製し、調節された透析に付した。ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)/コレステロール/DOPE-PEG-オクトレオチド(モル比10:1:1)の10mlクロロホルム/エタノール(容量比2:1)溶液を、コール酸ナトリウム(脂質/コール酸塩モル比0.6)と混合し、丸底フラスコ中、減圧下、55℃で蒸発乾固させた。残った薄膜を、10mMリン酸塩緩衝液pH7.4(5ml)に分散させ、イオン強度0.16に調節した。混合ミセルが自然に形成された。短時間平衡化させた後、混合ミセル溶液を10,000分子量カットオフのセルロースディスク膜を使用するミニ-リボブレップ(MINI-LIPOPREP)(Sialomed, Inc., USA)により60℃で24時間透析した。このようにして調製したリボソームを直接アッセ

イに使用した。

【0028】リボソームにカプセル化した抗がん剤の場合、ドキシソルビシンを、水和の際に、1.55mM硫酸アンモニウム溶液中PL/ドキシソルビシン=10/1(w/w)の割合で、丸底フラスコ中の乾燥薄脂質膜(thin lipid film)に加え、24時間60℃でインキュベーションした。カプセル化リボソームおよび遊離ドキシソルビシンを、123mMクエン酸ナトリウム(pH=5.5)で平衡化したTSK HW40ゲルカラムで分離した。カプセル化ドキシソルビシンの濃度を分光測光法により測定した(波長=490nm)。

【0029】本発明は、実施例として挙げられた上記実施の態様によって限定されるものではなく、特許請求の範囲によって定義される保護範囲内で種々変化させることが出来る。

### 【0030】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

```
<;110>; ACADEMIA SINICA
<;120>; A Novel Anti-cancer Drug Delivery System
<;130>; 172394
<;140>;
<;141>;
<;160>; 3
<;170>; PatentIn Ver. 2.1
<;210>; 1
<;211>; 8
<;212>; PRT
<;220>;
<;223>; Xaa=Thr(ol)
<;400>; 1
Phe Cys Phe Trp Lys Thr Cys Xaa
```

```

      1           5
<;210>; 2
<;211>; 8
<;212>; PRT
<;220>;
<;223>; Xaa=beta-(2-naphthyl)alanine
<;400>; 2
Xaa Cys Tyr Trp Lys Val Cys Thr
      1           5
<;210>; 3
<;211>; 8
<;212>; PRT
<;400>; 3
Phe Cys Tyr Trp Lys Val Cys Trp
      1           5
```

【図面の簡単な説明】

【図1】 第1図は、ソマトスタチン類縁体結合体を形成する一般的な図式と、3つの好ましいソマトスタチン類縁体の配列を示す。

【図2】 第2図は、MCF-7及びCHO細胞をフルオレセイン-オクトレオチドと共に4℃で30分間インキュベートした後の蛍光顕微鏡写真図である；標識はMCF-7細胞表面（B）に限定

されており（B）、MCF-7細胞を過剰量（1,000倍）の非蛍光オクトレオチドの存在下にインキュベートすると消失する（D）。CHO細胞の間では、標識は認め

られず（F）、これらの細胞を高濃度（500μg/ml）のフルオレセイン-オクトレオチドと共にインキュベートしても変化はなかった（H）。細胞の形態は、A、C、EおよびGに示されている；Bar=20μm。

【図3】 第3図は、MCF-7細胞によるフルオレセイン-オクトレオチドの内在化を示す；Bar=5μm。

【図4】 第4図は、オクトレオチド-結合タキソールがタキソールの細胞融合を実質的に保持することを示す。

【図5】 第5図は、オクトレオチド-結合パクリタキセルがMCF-7細胞に対して特異的であることを示す。

【図4】

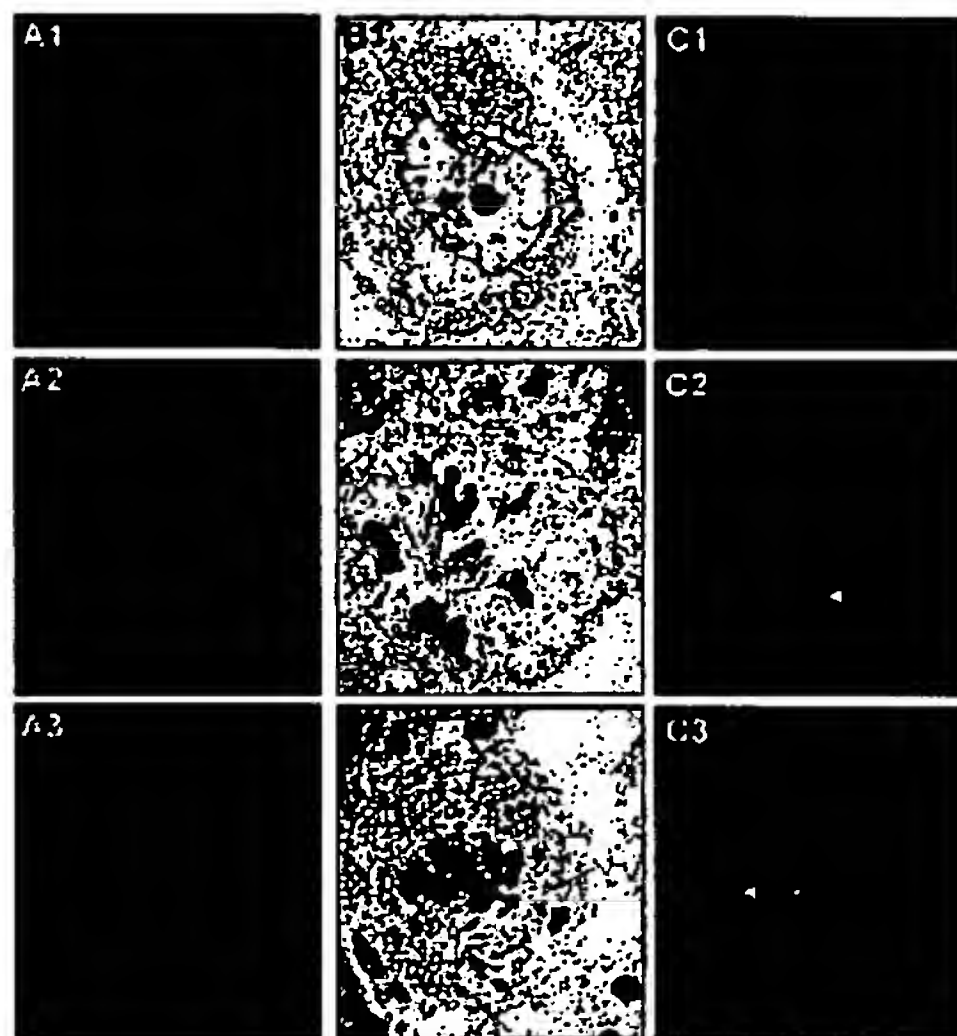


FIG.4

【図5】

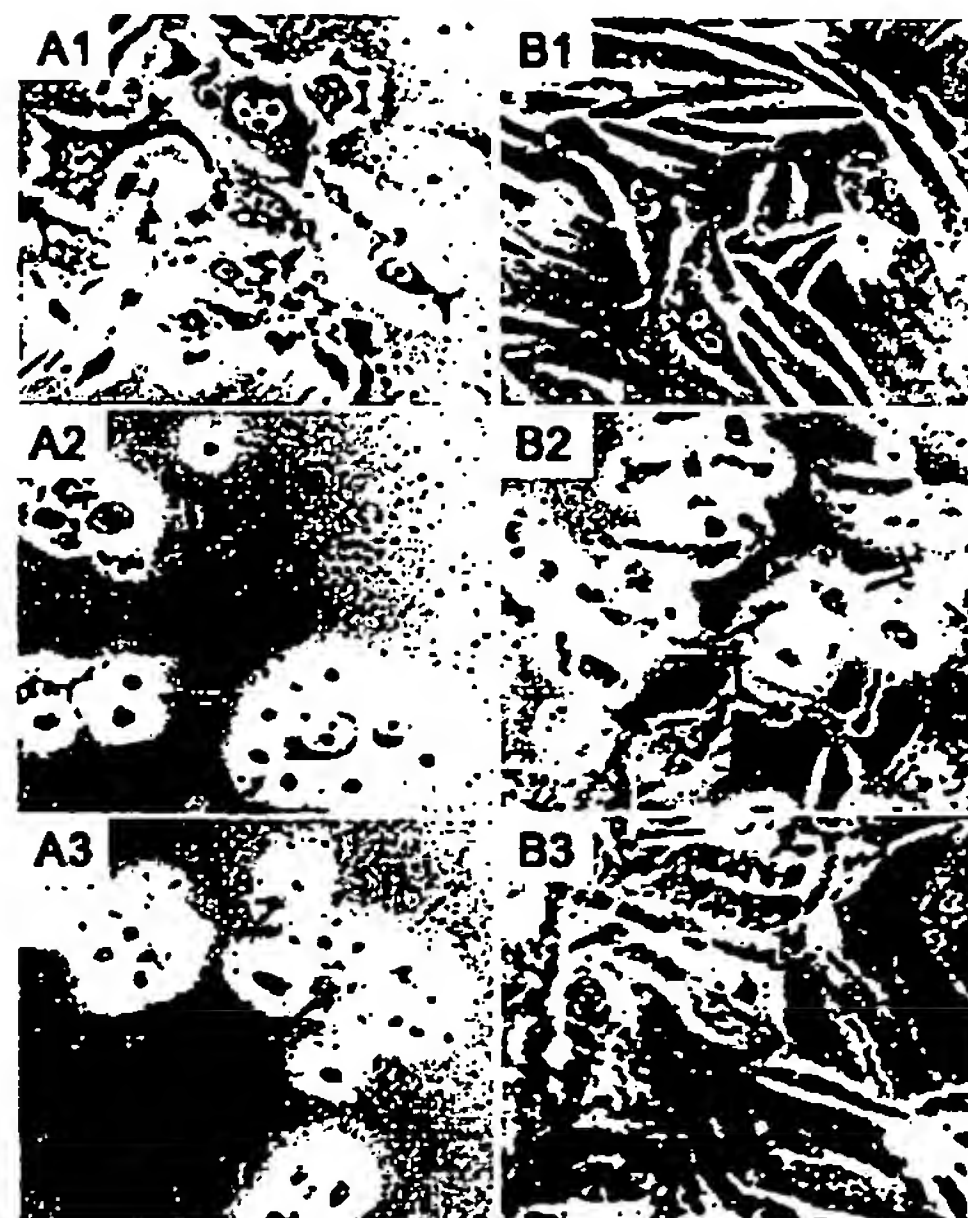


FIG.5



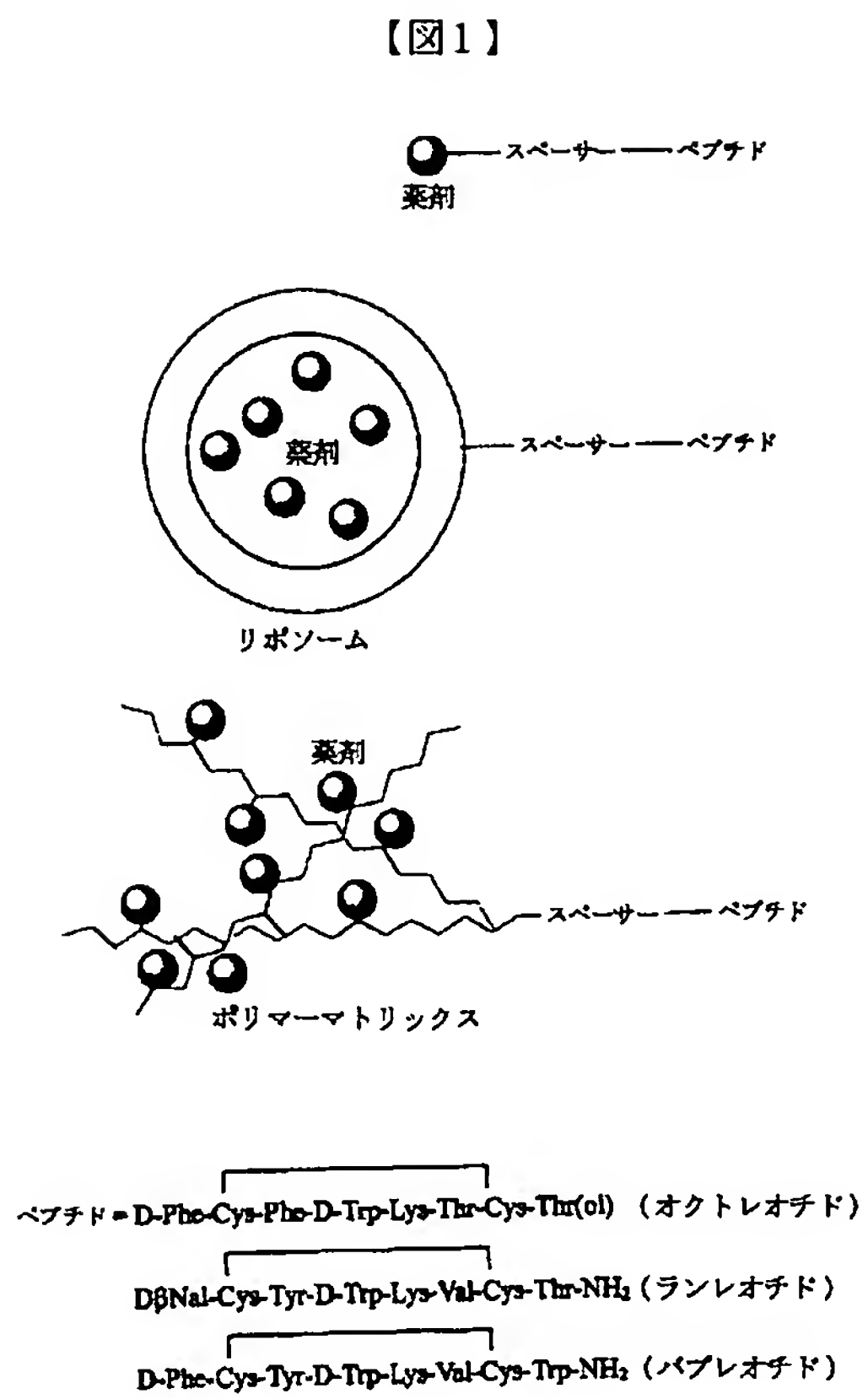


FIG.1

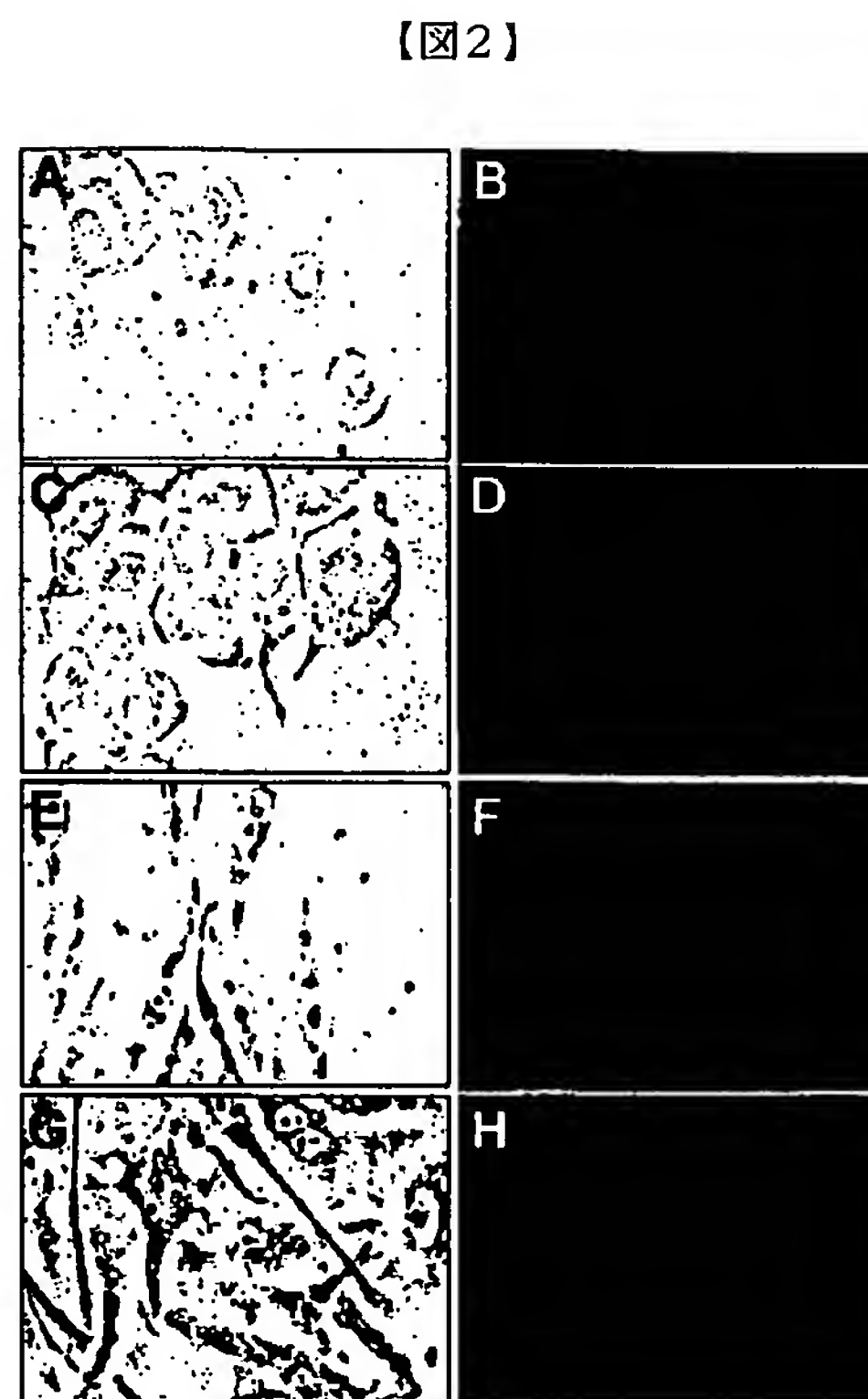


FIG.2

【図3】

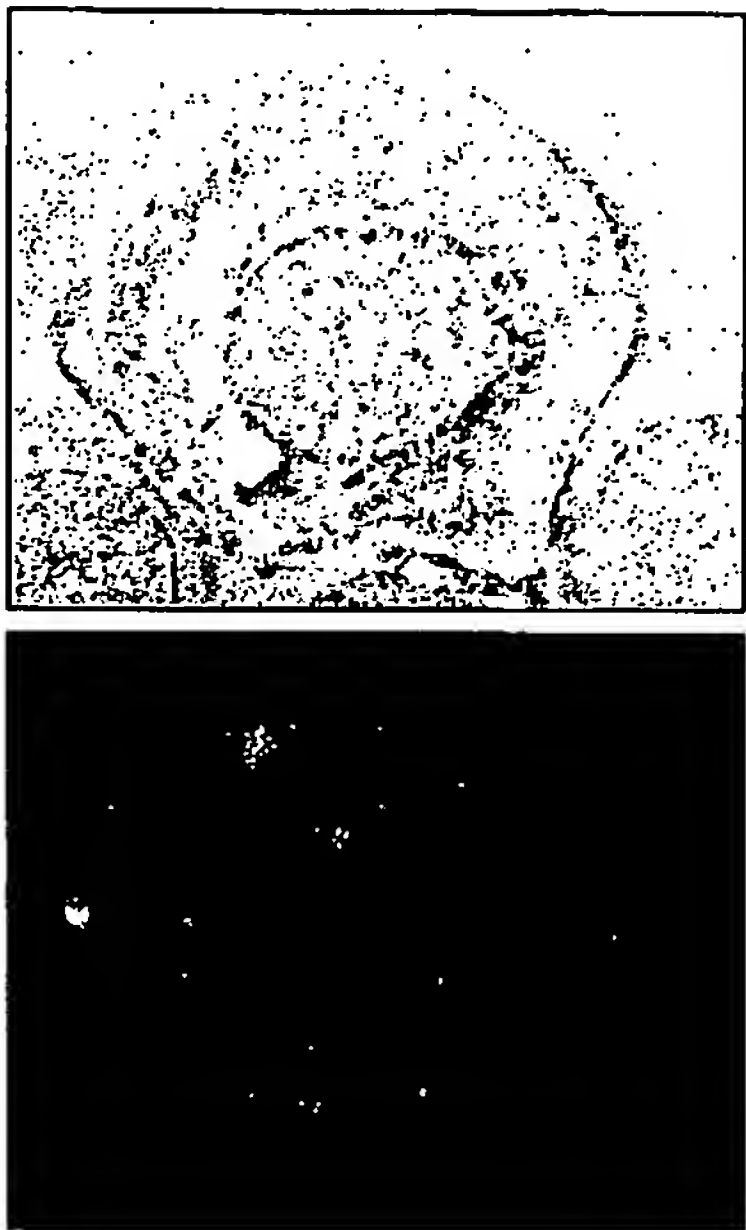


FIG.3

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード(参考)
B 0 1 J 13/02		B 0 1 J 13/02	Z
(72)発明者	インータ・ウ 台湾732タイナン、パイーホ、シンーチ・ ストリート26番	Fターム(参考)	4C076 AA19 CC27 CC41 DD15H DD63H DD70L FF63 FF67 FF68
(72)発明者	チュンーミン・フアン 台湾807カオション、サンーミン・ディス トリクト、タイーカン・ストリート34番		4C084 AA07 BA31 BA32 BA33 BA44 DB11 MA24 NA03 NA06 NA10 NA13 ZB262 4G005 AA07 AB21 BA20 BB11 DB22X DB22Y DC26X DC26Y DC43X DC43Y DC56Y DC56Z DC70X DC70Y EA03 4H045 AA10 BA15 BA32 BA51 EA28 FA34 FA51